

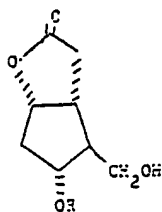


INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

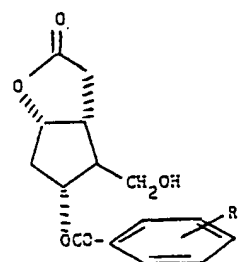
<p>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>4</sup> : C12P 41/00, 17/02 C07C 177/00</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 88/ 03570  (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 19. Mai 1988 (19.05.88)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE87/00520  (22) Internationales Anmeldedatum: 12. November 1987 (12.11.87)  (31) Prioritätsaktenzeichen: P 36 38 762.2  (32) Prioritätsdatum: 13. November 1986 (13.11.86)  (33) Prioritätsland: DE  (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Müllerstraße 170-178, D-1000 Berlin 65 (DE).  (72) Erfinder;und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : PETZOLDT, Karl [DE/DE]; Flachsweg 10, D-1000 Berlin 38 (DE). DAHL, Helmut [DE/DE]; Gollanczstraße 102, D-1000 Berlin 28 (DE).</p>		<p>(81) Bestimmungsstaaten: BG, HU, JP, US.  Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</p> <p style="text-align: center; font-size: 1.5em; font-weight: bold;">BEST AVAILABLE COPY</p>

(54) Title: RACEMIC SEPARATION OF 7 $\alpha$ -ACYLOXY-6 $\beta$ -HYDROXYMETHYL-2-OXABICYCLO[3.3.0]OCTANE-3-ONES BY STEREO-SPECIFIC ENZYMATIC ACYLATE HYDROLYSIS

(54) Bezeichnung: RACEMATSPALTUNG VON 7 $\alpha$ -ACYLOXY-6 $\beta$ -HYDROXY-METHYL-2-OXABICYCLO[3.3.0]OCTAN-3-ONEN DURCH STEREOSPEZIFISCHE ENZYMATISCHE ACYLAT-HYDROLYSE



(-)-I



(+)-II

#### (57) Abstract

Process for the manufacture of (-)-oxabicyclo[3.3.0]octanones of formula (-)-I, where R is hydrogen or the residue (a), in which R<sub>1</sub> has the notation of a hydrogen, alkyl with 1-7 C atoms, or phenyl. The process is characterized in that a racemic oxabicyclo[3.3.0]octanolone-acylate of formula (±)-II, where R<sub>1</sub> has the above notation, is subjected to a stereo-specific acylate hydrolysis and the (-)-I (R = (a)) is separated from the saponified (+)-I (R = H) or the saponified (-)-I (R = H) is separated from the unsaponified (+)-II.

#### (57) Zusammenfassung

Verfahren zur Herstellung von optisch aktiven (-)-Oxabicyclo[3.3.0]octanolonen der Formel (-)-I, worin R Wasserstoff oder den Rest (a) mit R<sub>1</sub> in der Bedeutung eines Wasserstoffs, Alkyls mit 1-7 C-Atomen oder Phenyls bedeuten kann, dadurch gekennzeichnet, daß man ein racemisches Oxabicyclo[3.3.0]octanolon-acylat der Formel (±)-II, worin R<sub>1</sub> die oben angegebene Bedeutung hat, enzymatisch einer stereospezifischen Acylat-Hydrolyse unterwirft und das (-)-I (R = (a)) vom verseiften (+)-I (R = H) abtrennt oder das verseifte (-)-I (R = H) vom unverseiften (+)-II abtrennt.

### **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

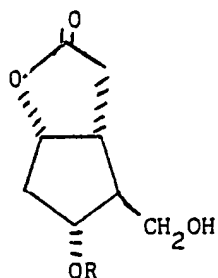
Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
AU	Australien	GA	Gabun	MW	Malawi
BB	Barbados	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BE	Belgien	HU	Ungarn	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	IT	Italien	RO	Rumänien
BJ	Benin	JP	Japan	SD	Sudan
BR	Brasilien	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SN	Senegal
CG	Kongo	LI	Liechtenstein	SU	Soviet Union
CH	Schweiz	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CM	Kamerun	LU	Luxemburg	TG	Togo
DE	Deutschland, Bundesrepublik	MC	Monaco	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DK	Dänemark	MG	Madagaskar		
FI	Finnland	ML	Mali		

Racematspaltung von  $7\alpha$ -Acyloxy-6 $\beta$ -hydroxy-methyl-2-oxabicyclo[3.3.0]octan-3-onen durch stereospezifische enzymatische Acylat-Hydrolyse

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur stereospezifischen Acylat-Hydrolyse racemischer  $7\alpha$ -Acyloxy-6 $\beta$ -hydroxymethyl-2-oxabicyclo[3.3.0]octan-3-onen zu den entsprechenden optisch aktiven Alkoholen mit Hilfe von Enzymen.

Es eignet sich besonders zur Herstellung von optisch aktiven (-)-Oxabicyclo[3.3.0]octanolonen der Formel (-)-I,



(-)-I ,

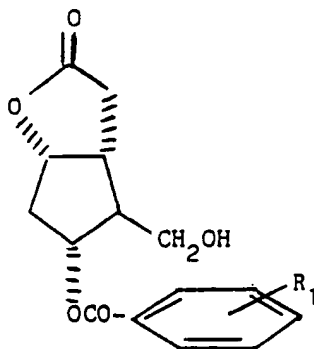
worin R Wasserstoff oder den Rest  $-\text{CO}-$



mit  $R_1$

in der Bedeutung eines Wasserstoffs, Alkyls mit 1-7 C-Atomen oder Phenyls bedeuten kann.

Es ist dadurch gekennzeichnet, daß man racemische Oxabicyclo[3.3.0]octanolon-acylate der Formel ( $\pm$ )-II,



( $\pm$ )-II ,

worin  $R_1$  die oben angegebene Bedeutung hat, enzymatisch einer stereospezifischen Acylat-Hydrolyse unterwirft und das (-)-I ( $R =$



) vom verseiften (+)-I ( $R = H$ ) abtrennt oder das ver-

seifte (-)-I ( $R = H$ ) vom unverseiften (+)-II abtrennt.

Wenn  $R_1$  einen Alkylrest mit 1-7 C-Atomen darstellt, sind damit die Reste Methyl, Ethyl, n-Propyl, Isopropyl, n-Butyl, Isobutyl, sek.-Butyl, tert.-Butyl, n-Pentyl, Isopentyl, sek.-Pentyl, Neopentyl, n-Hexyl, Isohexyl, n-Heptyl, Isoheptyl usw. gemeint.

Die Verbindungen der Formel (-)-I sind wertvolle Zwischenprodukte bei der Synthese pharmakologisch wertvoller Prostaglandin- und Prostacyclin-Analoga (Übersichten z.B. von J. Bindra, R. Bindra, Prostaglandin Synthesis, Academic Press, New York 1977 und von C. Szantay, L. Novak, Synthesis of Prostaglandins, Akademiai Kiado, Budapest, 1978).

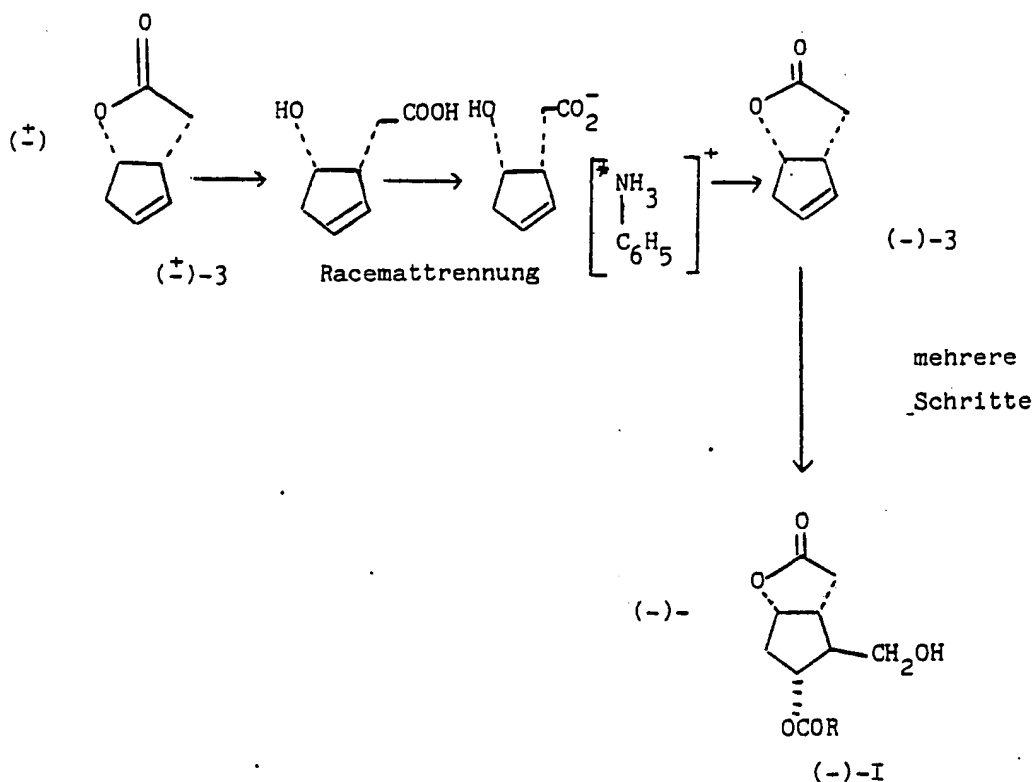
Zur Synthese der zu den Naturprodukten analogen Strukturen werden die Ester dieser Enantiomeren-Reihe benötigt.

Obwohl asymmetrische Synthesen bekannt sind, wird bei der technischen Herstellung die Einführung der optischen Aktivität auf dem Weg einer Racemattrennung bei der Zwischenstufe (+)-3 bevorzugt. Hierbei sind folgende Verfahrensschritte nötig:

1. Verseifung des Lactons zur Hydroxysäure.
2. Überführung in das Gemisch diastereomerer Salze, z.B. mit d- $\alpha$ -Phenylethylamin.
3. Kristallisation zur Gewinnung des diastereomeren reines Salzes.
4. Überführung des Salzes in das optisch aktive Lacton (-)-3.

## 5. Weitere Umsetzung zur optisch aktiven Vorstufe (-)-I.

Durch die Neigung der Hydroxysäure, das Lacton wieder zurückzubilden, bevor eine optische Aufreinigung erfolgen konnte, sowie durch Ausbeuteverluste beim Kristallisieren, hat sich das nachstehende Verfahren nicht bewährt.




Bei der vorliegenden Erfindung wird die Trennung auf der Stufe der racemischen 7 $\alpha$ -Acyloxy-6 $\beta$ -hydroxymethyl-2-oxa-bicyclo[3.3.0]octan-3-one der Formel (+)-II durch enzymatische Verseifung vorgenommen, die

zu einem Produktgemisch führt, aus dem die gewünschten Verbindungen der Formel (-)-I entweder durch Extraktion oder aus der wässrigen Phase erhalten werden können.

Die Ausgangsverbindungen lassen sich nach GB 1 579 464 herstellen.

Die Verwendung der nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhaltenen optisch aktiven Ester der Formel (-)-I

(R = -CO-) als Zwischenprodukte für die Herstellung

von pharmakologisch wertvolle. Prostaglandin- und Prostacyclin-Analoga geht aus den bereits genannten Übersichtsartikeln hervor.

Das ebenfalls erhältliche optisch aktive Diol der Formel (-)-I (R = H) kann besonders dann Verwendung finden, wenn bei der Folgesynthese zunächst die primäre Hydroxylgruppe geschützt werden muß und die sekundäre Hydroxylgruppe freibleiben kann. Dies ist z.B. bei der Synthese von Carbacyclin-Zwischenprodukten der Fall, wie sie in EP 41 661 beschrieben wird.

Als Enzyme eignen sich für das erfindungsgemäße Verfahren vorzugsweise

Subtilisin aus *Bacillus subtilis* (Fa. Boehringer, Mannheim)

Lipase "Sclerotinia" (Fa. Nagase)

Alkaline Proteinase (Fa. Nagase)

Protease aus *Bacillus subtilis*

Alcalase T (Fa. NOVO)

Die Enzyme können sowohl in gelöster, suspendierter oder immobilisierter Form (z.B. an BrCN-aktivierter Sepharose oder an Oxiranacrylperlen oder in irgendeiner anderen immobilisierten Form) eingesetzt werden.

Die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren herstellbaren optisch aktiven Oxabicyclooctanolon-Derivate der Formel (-)-I sind wertvolle Zwischenprodukte für die Synthese pharmakologisch wirksamer Prostaglandine und Prostacycline. Es zeigte sich, daß der größere Teil der stereospezifisch hydrolysierenden Enzyme die racemischen Verbindungen der Formel (+)-II zum optisch aktiven Diol der Formel (+)-I (R = H) verseift, wobei die in ihrer absoluten Konfiguration dem natürlichen Prostacyclin PGJ<sub>2</sub> entsprechende Komponente des eingesetzten Racemats (+)-II unverseift liegen bleibt  $\Delta(-)-I(R = \text{CO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{R}_1)$

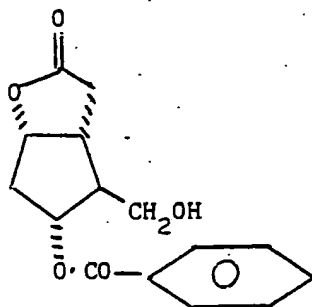
und nach Abtrennung vom Diol zur Synthese natürlich konfigurierter Prostacyclin-Analoga eingesetzt werden kann.

Andere Enzyme wiederum verseifen von den beiden Komponenten des eingesetzten Racemats (+)-II die natürlich konfigurierte Form zum Diol (-)-I(R = H), während das "falsche", unnatürlich konfigurierte Enantiomere unverseift bleibt. In diesem Falle wird das Diol für die Synthese PGJ<sub>2</sub>-analoger Prostacycline herangezogen. Das erfindungsgemäße Verfahren arbeitet ansonsten unter an sich bekannten Bedingungen, die für enzymatische Reaktionen bekannt sind. Der Ablauf der enzymatischen Umwandlung wird durch Analyse laufend entnommener Proben verfolgt. Als Analysemethoden eignen sich HPLC oder dünnschichtchromatographische Schnellanalysen (Kieselgelplatten von Merck/Darmstadt, Entwicklung mittels Methylenchlorid/Aceton 1:1 und Anfärben mit Schwefelsäure).

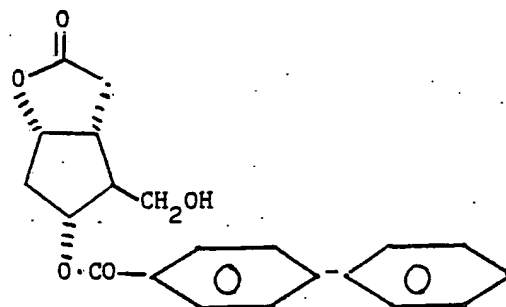
Die Reaktion wird abgebrochen und der Ansatz aufgearbeitet, sowie 50 % des eingesetzten racemischen Substrates umgesetzt sind.

ERSATZBLATT

Das erfinderische Verfahren eignet sich besonders zur stereospezifischen Verseifung folgender Prostaglandin-Zwischenstufen:



(+)-1



(+)-2



Die folgenden Ausführungsbeispiele dienen zur Erläuterung des erfindungsgemäßen Verfahrens.

#### Beispiel 1

300 mg (+)-7 $\alpha$ -Benzoyloxy-6 $\beta$ -hydroxymethyl-2-oxabicyclo [3.3.0] octan-3-on werden in 9 ml Ethanol gelöst und mit einer Lösung von 750 mg Alkaline Proteinase (Fa. Nagase) in 100 ml 0,1 M Phosphatpuffer pH 7 vereinigt. Die Lösung wird bei 28° C auf einem Rotationsschüttler geschüttelt, wobei der Ablauf der Reaktion durch Analyse laufend entnommener Proben verfolgt wird. Nach 19 Stunden Reaktionszeit sind 50 % des eingesetzten Substrates umgewandelt. Der Ansatz wird nun 3 mal mit je 50 ml Methylisobutylketon extrahiert, wobei das unumgesetzte Benzoat in die MiBK-Phase wandert, während die verseifte Verbindung in der wässrigen Phase verbleibt.

Die MiBK -Extrakte werden vereinigt und im Vakuum zur Trockne eingeeengt. Der verbliebene Rückstand wird aus Aceton umkristallisiert. Man erhält 135 mg (-)-7 $\alpha$ -Benzoyloxy-6 $\beta$ -hydroxymethyl-2-oxabicyclo [3.3.0] octan-3-on vom Schmelzpunkt 116-117° C und einem Drehwert von  $[\alpha]_D^{20}$  -80,5° (c = 1,050 in HCCl<sub>3</sub>).

#### Beispiel 2

300 mg (+)-7 $\alpha$ -Benzoyloxy-6 $\beta$ -hydroxymethyl-2-oxabicyclo [3.3.0] octan-3-on werden in 100 ml 0,1 M Phosphatpuffer pH 7 suspendiert, 750 mg Subtilisin aus Bacillus subtilis (Fa. Boehringer, Mannheim) zugefügt und die Mischung mit einem Ultra-Turrax homogenisiert. Die Suspension wird anschließend 16 Stunden bei 28°C auf einem Rotationsschüttler geschüttelt, wonach 50% des eingesetzten racemischen Substrates verseift sind. Der Ansatz wird nun im Wasserstrahlvakuum zur Trockne eingeeengt, der verbliebene Rückstand 3 mal mit Methanol eluiert, die vereinigten Methanol-Eluate wiederum zur Trockne gebracht und über eine Kieselgelsäure chromatographiert (Elutionsmischung Methylenchlorid-Aceton 66 + 33). Die zuerst eluierte Fraktion 1 enthält 122 mg (-)-7 $\alpha$ -Benzoyloxy-6 $\beta$ -hydroxymethyl-2-oxabicyclo [3.3.0] octan-3-on vom Schmelzpunkt 114-116° C und einem Drehwert von  $[\alpha]_D$  -82,3° (c = 1,015 in Methanol).

Beispiel 3

Unter den Bedingungen des Beispiels 2 werden 300 mg ( $\pm$ )-7 $\alpha$ -Benzoyloxy-6 $\beta$ -hydroxymethyl-2-oxabicyclo [3.3.0] octan-3-on in Phosphatpuffer pH7 mit 750 mg Lipase Sclerotina (Fa. Nagase) 64 Stunden bei 28° C behandelt. Nach säulenchromatographischer Abtrennung des verseiften unnatürlich konfigurierten Enantiomeren erhält man 115 mg (-)-7 $\alpha$ -Benzoyloxy-6 $\beta$ -hydroxymethyl-2-oxabicyclo [3.3.0] octan-3-on vom Schmelzpunkt 115-116° und einem Drehwert von  $[\alpha]_D$  -79,8° (c = 1,02 in Methanol).

Beispiel 4

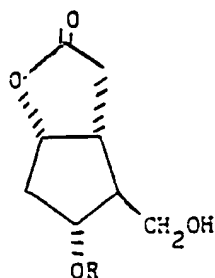
Unter den Bedingungen des Beispiels 2 werden 300 mg ( $\pm$ )-7 $\alpha$ -Benzoyloxy-6 $\beta$ -hydroxymethyl-2-oxabicyclo [3.3.0] octan-3-on in Phosphatpuffer pH7 mit 750 mg Alcalase T (Fa. NOVO) 40 Stunden bei 28° C hydrolysiert. Nach säulenchromatographischer Auftrennung des Reaktionsgemisches erhält man 142 mg (-)-7  $\alpha$ -Benzoyloxy-6 $\beta$ -hydroxymethyl-2-oxabicyclo [3.3.0] octan-3-on vom Schmelzpunkt 112-114° und einem Drehwert von  $[\alpha]_D$  -77,1° (c = 1,005 in Methanol).

Beispiel 5

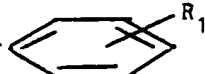
Unter den Bedingungen des Beispiels 2 werden 300 mg ( $\pm$ )-7 $\alpha$ -Benzoyloxy-6 $\beta$ -hydroxymethyl-2-oxabicyclo [3.3.0] octan-3-on in Phosphatpuffer pH 7 mit 750 mg Protease aus Bacillus subtilis 15 Stunden bei 28° C behandelt. Nach säulenchromatographischer Auftrennung des Reaktionsgemisches erhält man 119 mg (-)-7 $\alpha$ -Benzoyloxy-6 $\beta$ -hydroxymethyl-2-oxabicyclo [3.3.0] octan-3-on vom Schmelzpunkt 113-115° C und einem Drehwert von  $[\alpha]_D$  - 78,9° (c = 1,025 in Methanol).

P a t e n t a n s p r ü c h e

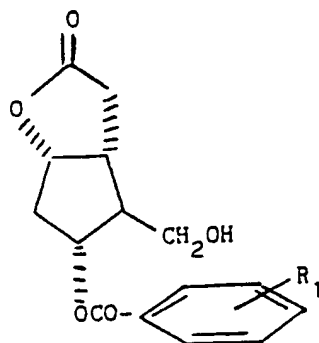
- 1) Verfahren zur Herstellung von optisch aktiven (-)-Oxabicyclo[3.3.0]octanolonen der Formel (-)-I,



• (-)-I ,

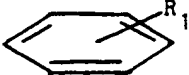
worin R Wasserstoff oder den Rest  $\text{-CO-}$   mit

$R_1$  in der Bedeutung eines Wassertoffs, Alkyls mit 1-7 C-Atomen oder Phenyls bedeuten kann,  
dadurch gekennzeichnet, daß man ein racemisches Oxabicyclo[3.3.0]-octanolon-acylat der Formel ( $\pm$ )-II,



( $\pm$ )-II ,

worin  $R_1$  die oben angegebene Bedeutung hat, enzymatisch einer stereospezifischen Acylat-Hydrolyse unterwirft und das (-)-I ( $R =$

$\text{-CO-}$   ) vom verseiften (+)-I ( $R = H$ ) abtrennt oder

das verseifte (-)-I ( $R = H$ ) vom unverseiften (+)-II abtrennt.

- 2) Verfahren nach Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß man als Enzym Subtilisin aus *Bacillus subtilis*, Lipase Sclerotinia, Alkaline Proteinase, Protease aus *Bacillus subtilis* oder Alcalase T verwendet.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/DE 87/00520

<b>I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> (if several classification symbols apply, indicate all) <sup>4</sup> According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC Int. Cl. <sup>4</sup> C 12 P 41/00; C 12 P 17/02; C 07 C 177/00																				
<b>II. FIELDS SEARCHED</b> <div style="text-align: center; border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black; margin: 5px 0;">Minimum Documentation Searched <sup>7</sup></div> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 25%; border: 1px solid black; padding: 5px;">Classification System</td> <td style="border: 1px solid black; padding: 5px;">Classification Symbols</td> </tr> <tr> <td style="border: 1px solid black; padding: 5px;">Int. Cl. <sup>4</sup></td> <td style="border: 1px solid black; padding: 5px;">C 12 P; C 07 C; C 07 D</td> </tr> </table> <div style="text-align: center; border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black; margin: 5px 0;">Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched <sup>8</sup></div>			Classification System	Classification Symbols	Int. Cl. <sup>4</sup>	C 12 P; C 07 C; C 07 D														
Classification System	Classification Symbols																			
Int. Cl. <sup>4</sup>	C 12 P; C 07 C; C 07 D																			
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <sup>9</sup></b> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 10%; border: 1px solid black; padding: 5px;">Category <sup>9</sup></th> <th style="width: 70%; border: 1px solid black; padding: 5px;">Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup></th> <th style="width: 20%; border: 1px solid black; padding: 5px;">Relevant to Claim No. <sup>13</sup></th> </tr> <tr> <td style="border: 1px solid black; padding: 5px; vertical-align: top;">P, A</td> <td style="border: 1px solid black; padding: 5px;">FR, A, 2582648 (NISSHIN FLOUR) 5 December 1986 see claims</td> <td style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center; vertical-align: top;">1</td> </tr> <tr> <td style="border: 1px solid black; padding: 5px; vertical-align: top;">A</td> <td style="border: 1px solid black; padding: 5px;">EP, A, 0041661 (SCHERING) 16 December 1981 see page 3; claims</td> <td style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center; vertical-align: top;">1</td> </tr> <tr> <td style="border: 1px solid black; padding: 5px; vertical-align: top;">A</td> <td style="border: 1px solid black; padding: 5px;">GB, A, 1579464 (CHINOIN) 19 November 1980 see claims</td> <td style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center; vertical-align: top;">1</td> </tr> <tr> <td style="border: 1px solid black; padding: 5px; vertical-align: top;">A</td> <td style="border: 1px solid black; padding: 5px;">EP, A, 0127386 (SUMITOMO) 5 December 1984 see claims</td> <td style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center; vertical-align: top;">1</td> </tr> <tr> <td colspan="3" style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;">-----</td> </tr> </table>			Category <sup>9</sup>	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>	P, A	FR, A, 2582648 (NISSHIN FLOUR) 5 December 1986 see claims	1	A	EP, A, 0041661 (SCHERING) 16 December 1981 see page 3; claims	1	A	GB, A, 1579464 (CHINOIN) 19 November 1980 see claims	1	A	EP, A, 0127386 (SUMITOMO) 5 December 1984 see claims	1	-----		
Category <sup>9</sup>	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>																		
P, A	FR, A, 2582648 (NISSHIN FLOUR) 5 December 1986 see claims	1																		
A	EP, A, 0041661 (SCHERING) 16 December 1981 see page 3; claims	1																		
A	GB, A, 1579464 (CHINOIN) 19 November 1980 see claims	1																		
A	EP, A, 0127386 (SUMITOMO) 5 December 1984 see claims	1																		
-----																				
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p><sup>10</sup> Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"A" document member of the same patent family</p> </div> </div>																				
<b>IV. CERTIFICATION</b> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; border: 1px solid black; padding: 5px;">Date of the Actual Completion of the International Search</td> <td style="width: 50%; border: 1px solid black; padding: 5px;">Date of Mailing of this International Search Report</td> </tr> <tr> <td style="border: 1px solid black; padding: 5px;">26 February 1988 (26.02.88)</td> <td style="border: 1px solid black; padding: 5px;">8 April 1988 (08.04.88)</td> </tr> <tr> <td style="border: 1px solid black; padding: 5px;">International Searching Authority</td> <td style="border: 1px solid black; padding: 5px;">Signature of Authorized Officer</td> </tr> <tr> <td style="border: 1px solid black; padding: 5px;">EUROPEAN PATENT OFFICE</td> <td style="border: 1px solid black; padding: 5px;"></td> </tr> </table>			Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report	26 February 1988 (26.02.88)	8 April 1988 (08.04.88)	International Searching Authority	Signature of Authorized Officer	EUROPEAN PATENT OFFICE											
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report																			
26 February 1988 (26.02.88)	8 April 1988 (08.04.88)																			
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer																			
EUROPEAN PATENT OFFICE																				

# ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.

DE 8700520  
SA 19440

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.  
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 21/03/88  
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR-A- 2582648	05-12-86	JP-A- 61280294	10-12-86
		DE-A- 3618538	18-12-86
		GB-A- 2178423	11-02-87
EP-A- 0041661	16-12-81	DE-A- 3021895	24-12-81
		JP-A- 57026644	12-02-82
		US-A- 4359581	16-11-82
		AT-B- E8496	15-08-84
GB-A- 1579464	19-11-80	Keine	
EP-A- 0127386	05-12-84	JP-A- 59216845	06-12-84
		US-A- 4571436	18-02-86
		JP-A- 60001151	07-01-85

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen **PCT/DE 87/00520**

<b>I. KLASSEFIZKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS</b> (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben) <sup>6</sup> Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC Int. Cl. <sup>4</sup> <b>C 12 P 41/00; C 12 P 17/02; C 07 C 177/00</b>																	
<b>II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE</b> <div style="text-align: right; font-size: small;">Recherchierter Mindestprüfstoff<sup>7</sup></div> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 20%; padding: 5px;">Klassifikationssystem</td> <td style="padding: 5px;">Klassifikationssymbole</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">Int. Cl.<sup>4</sup></td> <td style="padding: 5px;"><b>C 12 P; C 07 C; C 07 D</b></td> </tr> </table> <div style="text-align: center; font-size: x-small; margin-top: 5px;">Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen<sup>8</sup></div>			Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole	Int. Cl. <sup>4</sup>	<b>C 12 P; C 07 C; C 07 D</b>											
Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole																
Int. Cl. <sup>4</sup>	<b>C 12 P; C 07 C; C 07 D</b>																
<b>III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN<sup>9</sup></b> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 10%; padding: 5px;">Art*</th> <th style="width: 70%; padding: 5px;">Kennzeichnung der Veröffentlichung<sup>11</sup>, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile<sup>12</sup></th> <th style="width: 20%; padding: 5px;">Betr. Anspruch Nr.<sup>13</sup></th> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">P, A</td> <td style="padding: 5px;">FR, A, 2582648 (NISSHIN FLOUR) 5. Dezember 1986 siehe Patentansprüche --</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">A</td> <td style="padding: 5px;">EP, A, 0041661 (SCHERING) 16. Dezember 1981 siehe Seite 3; Patentansprüche --</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">A</td> <td style="padding: 5px;">GB, A, 1579464 (CHINOIN) 19. November 1980 siehe Patentansprüche --</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">A</td> <td style="padding: 5px;">EP, A, 0127386 (SUMITOMO) 5. Dezember 1984 siehe Patentansprüche  -----</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1</td> </tr> </table> <div style="font-size: x-small; margin-top: 10px;"> <p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen<sup>10</sup>:</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"&amp;" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p> </div>			Art*	Kennzeichnung der Veröffentlichung <sup>11</sup> , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile <sup>12</sup>	Betr. Anspruch Nr. <sup>13</sup>	P, A	FR, A, 2582648 (NISSHIN FLOUR) 5. Dezember 1986 siehe Patentansprüche --	1	A	EP, A, 0041661 (SCHERING) 16. Dezember 1981 siehe Seite 3; Patentansprüche --	1	A	GB, A, 1579464 (CHINOIN) 19. November 1980 siehe Patentansprüche --	1	A	EP, A, 0127386 (SUMITOMO) 5. Dezember 1984 siehe Patentansprüche  -----	1
Art*	Kennzeichnung der Veröffentlichung <sup>11</sup> , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile <sup>12</sup>	Betr. Anspruch Nr. <sup>13</sup>															
P, A	FR, A, 2582648 (NISSHIN FLOUR) 5. Dezember 1986 siehe Patentansprüche --	1															
A	EP, A, 0041661 (SCHERING) 16. Dezember 1981 siehe Seite 3; Patentansprüche --	1															
A	GB, A, 1579464 (CHINOIN) 19. November 1980 siehe Patentansprüche --	1															
A	EP, A, 0127386 (SUMITOMO) 5. Dezember 1984 siehe Patentansprüche  -----	1															
<b>IV. BESCHEINIGUNG</b> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; padding: 5px;">           Datum des Abschlusses der internationalen Recherche  <b>26. Februar 1988</b> </td> <td style="width: 50%; padding: 5px;">           Absendedatum des internationalen Recherchenberichts  <div style="text-align: right; font-size: large;"><b>08 APR 1988</b></div> </td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">           Internationale Recherchenbehörde  <div style="text-align: center;"><b>Europäisches Patentamt</b></div> </td> <td style="padding: 5px;">           Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten  <div style="text-align: right;">   <b>P.C.G. VAN DER PUTTEN</b> </div> </td> </tr> </table>			Datum des Abschlusses der internationalen Recherche <b>26. Februar 1988</b>	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts <div style="text-align: right; font-size: large;"><b>08 APR 1988</b></div>	Internationale Recherchenbehörde <div style="text-align: center;"><b>Europäisches Patentamt</b></div>	Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten <div style="text-align: right;">   <b>P.C.G. VAN DER PUTTEN</b> </div>											
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche <b>26. Februar 1988</b>	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts <div style="text-align: right; font-size: large;"><b>08 APR 1988</b></div>																
Internationale Recherchenbehörde <div style="text-align: center;"><b>Europäisches Patentamt</b></div>	Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten <div style="text-align: right;">   <b>P.C.G. VAN DER PUTTEN</b> </div>																

# ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.

DE 8700520  
SA 19440

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.  
Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am 21/03/88  
Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
FR-A- 2582648	05-12-86	JP-A- 61280294	10-12-86
		DE-A- 3618538	18-12-86
		GB-A- 2178423	11-02-87
EP-A- 0041661	16-12-81	DE-A- 3021895	24-12-81
		JP-A- 57026644	12-02-82
		US-A- 4359581	16-11-82
		AT-B- E8496	15-08-84
GB-A- 1579464	19-11-80	Keine	
EP-A- 0127386	05-12-84	JP-A- 59216845	06-12-84
		US-A- 4571436	18-02-86
		JP-A- 60001151	07-01-85



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**